VERMEHRUNG VON POLIOMYELITISVIREN IN KULTUREN VON MENSCHLICHEN LEUKOZYTEN

Karin Eckhardt

1968

Aus der Kinderklinik der Universität München

Direktor: Professor Dr. A. Wiskott

VERMEHRUNG VON POLIOMYELITISVIREN IN KULTUREN VON MENSCHLICHEN LEUKOZYTEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Karin Eckhardt
aus
Heidenheim/Brenz
1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der

UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Berichterstatter:	Prof. Dr. O. Goetz
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. A. Wiskott
Dekan:	Prof. Dr. F. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Mai 1968

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. O. Goetz und Herrn Dr. P. Peller für das Interesse, das sie dem Thema und den Ergebnissen dieser Arbeit entgegenbrachten, aufrichtig danken. Die gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit sei besonders dankbar erwähnt.

Herzlicher Dank gilt ferner Frl. H. Nickel und Frl. K. Oettrich, die mir bei der Durchführung der Versuche gern und interessiert geholfen haben.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Friedrich Bauer-Stiftung und der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	
	1 Allgemeines	1
	2 Multiplikation von Poliomyelitisviren	2
	3 Virusmultiplikation in Leukozytenkulturen	3
	4 Multiplikation von Poliomyelitisviren in Leukozytenkulturen und Aufgabenstellung	5 6
II.	METHODIK	
	1 Anlegen der Leukozytenkulturen	7
	2 Virusinoculation	8
	3 Virustitration	9
III.	ERGEBNISSE	
	1 Verhalten der Leukozyten in der Kultur	10
	2 Titerverhalten von Poliomyelitisviren in Leukozytenkulturen	
	21 Allgemeine Beobachtungen	12
	22 Die Einzelversuche	15
	23 Titermittelwertkurven	19
	3 Abhängigkeit des Titerverhaltens von den Ausgangsbedingungen:	
	31 Inoculationstiter	19
	32 Leukozytenkonzentration	21
	33 Relat. Lymphozytenanteil	21
IV.	DISKUSSION	
	1 Multiplikation von Poliomyelitisviren in Leukozytenkulturen	24
	2 Besondere Merkmale des Multiplikationsverhaltens von Poliomyelitisviren in Leukozytenkulturen	25

Seite

21 Initialer Titerabfall 26

22 Niedrige Virusmultiplikationsrate 28

3 Lymphozyten als Ort der Virusmultiplikation in der Kultur 29

4 Abhängigkeit der Virusmultiplikation von den Ausgangsbedingungen 30

5 Vergleich der Ergebnisse unserer Versuche mit den bisher vorliegenden Arbeiten 32

6 Möglichkeit einer Multiplikation von Poliomyelitisviren in den Leukozyten innerhalb der Blutbahn 35

V. ZUSAMMENFASSUNG 38

VI. LITERATURVERZEICHNIS 41

I. EINLEITUNG

Allgemeines

Den Rahmen für das Thema dieser Arbeit im weiteren Sinne bildet die Pathogenese der Poliomyelitisinfektion. Sie wird heute im wesentlichen durch Theorien von Sabin und Bodian erklärt (1-3). In beiden Theorien wird eine Virämie als wichtiger Teilabschnitt des Infektionsablaufs angesehen.

Die Virämie gilt - wie für viele andere Virusinfektionen - für die Poliomyelitisinfektion durch Versuche von Bodian und Horstmann (4-7) - unabhängig voneinander durchgeführt - seit 1954 als erwiesen. Während einer Dauer von ungefähr 2 Tagen, und zwar vor Auftreten paralytischer Erscheinungen, gelang ihnen eine Isolierung von Poliomyelitisviren aus dem Blut an dieser Infektion erkrankter Patienten.

Sabin und Bodian vertreten in ihren Theorien noch die Meinung, daß während der Virämie allein durch den Blutstrom eine Verbreitung der infektiösen Partikel im Organismus bewirkt wird. Das bedeutet, daß das Blut lediglich als passives Transportorgan für die Viren angesehen wird. Es liegt jedoch nahe, neben dieser rein passiven Transportfunktion des Blutes auch eine aktive Beteiligung der zellulären Blutbestandteile am Infektionsablauf zu vermuten; dies deshalb, weil die spezifische Eigenart der Viren eine Existenz nur im fremden Zellstoffwechsel gestattet.

Es stellt sich weiterfolgernd also die Frage nach der besonderen Bedeutung und dem Verhalten der Leukozyten während der virämischen Phase.

Die zahlreichen vorliegenden Arbeiten kommen zu keinem übereinstimmenden Ergebnis. Über Art, Bedeutung und Auswirkung des Verhältnisses Leukozyt - Poliomyelitisvirus werden insbesondere die folgenden drei Möglichkeiten untersucht und diskutiert:

1. Die Leukozyten haben eine Abwehrfunktion. Sie nehmen die Viren auf - möglicherweise als Anreiz zur Antikörperbildung - um sie dann so schnell wie möglich abzutöten (33,38).

2. Die Leukozyten üben eine Schutz- und Transportfunktion aus. Sie nehmen die Viren auf, um sie für längere Zeit virulent zu halten und zu den Vermehrungs- und Wirkungsorten zu befördern (36,39).

3. Die Leukozyten sind neben vielen anderen Zellen aktiv an der Multiplikation der Viren im Körper beteiligt (36,40,30).

Mit der unter Punkt 3 angeführten Möglichkeit einer Multiplikation von Poliomyelitisviren in Leukozyten befassen sich die in der vorliegenden Arbeit dargelegten und diskutierten Versuche. An dieser speziellen Aufgabenstellung sollen bisherige Ergebnisse der Virusforschung - soweit sie das Thema tangieren - stichwortartig bzw. in Literaturhinweisen aufgeführt werden, wobei drei Bereiche zu unterscheiden sind.

1. Multiplikation von Polyomyelitisviren in verschiedenen Zellen

Eine Aufnahme und Vermehrung von Poliomyelitisvirus von und in den verschiedensten menschlichen und tierischen Zellen kann durch zahlreiche, auf diesem Gebiet vorliegende Forschungsergebnisse grundsätzlich als erwiesen angenommen werden. Sehr ausführliche Versuche sind besonders mit Hela-Zellen, KB-Zellen und embryonalem Gewebe durchgeführt worden (8-14). Von besonderem Interesse ist ferner die nachgewiesene Vermehrung von

Poliomyelitisviren in menschlichen intestinalen, pharyngealen Zellen (15-18) und Lymphknoten (19,20) einerseits, sowie in Ganglien und ZNS andererseits (18,19).

2. Virusmultiplikation in Leukozyten

Durch Fluoreszens- und Elektronenmikroskopische Methoden konnte in mehreren Fällen erstmalig der Nachweis erbracht werden, daß das Virus von den Leukozyten aufgenommen werden kann.

1959 gelang es Kantoch (21) nach Inkubation tierischer Leukozytenkulturen mit Coxsackieviren in einer großen Anzahl von Leukozyten Viruspartikel nachzuweisen. In gleicher Weise konnte Baratawidjaja (22) das Virus der lymphozytären Choriomeningitis und Rabies-Virus in Leukozyten beobachten. Interessante Versuche wurden mit Influenza-Viren durchgeführt (23). Es zeigte sich, daß der ganze Erythrozyt mit adsorbiertem Virus von den Leukozyten phagozytiert wird. Der Erythrozyt wird gleich darauf wieder ausgestoßen, während das Virus jedoch in der Zelle liegen bleibt. Inglot und Davenport (24) stellten in ihren Versuchen fest, daß an weiße Blutzellen assoziiertes Virus gegenüber Antikörpern wesentlich weniger anfällig ist als an rote Blutzellen gebundenes.

Sommerville (25) fand unter Leukozyten von Patienten mit durch Coxsackie-B.Virus verursachter aseptischer Meningitis 5-85 % fluoreszierende Zellen. Diese verschwanden mit dem langsamen Ansteigen des Antikörpertiters wieder vollständig aus dem Blut. Dieselben Verhaltensweisen hat Sommerville bei Adeno und Herpesvirusinfektionen beobachten können; dies mit der besonderen Feststellung, daß der größte Teil der infizierten Zellen von polymorphkerniger Beschaffenheit war.

Über eine Multiplikation verschiedener Viren in Leukozyten wird erstmalig in den folgenden Arbeiten berichtet:

Die Vermutung, daß Columbia-SK-Virus sich in Leukozyten vermehren kann (26), wurde 1963 in Tierversuchen bewiesen (27).

Eine Multiplikation von Masernviren in menschlichen Leukozytenkulturen konnte Berg (28) 1961 in 12 Versuchen erstmalig eindeutig nachweisen. Bei Ausgangstitern von $10^{1,8-2,8}$ $TCID_{50}/0,1$ ml steigen die Titer zwischen 4. und 7. Tag auf Werte, die maximal bei $10^{4,7}$ $TCID_{50}/0,$ ml liegen.

Gresser lieferte 1963 den Nachweis, daß während der menschlichen Maserninfektion die Leukozyten Träger infektiösen Antigenmaterials sind (29). Aus den Leukozytenfraktionen von 11 Masernpatienten konnte er in 10 Fällen in den ersten 24 Stunden nach Ausbruch des Exanthem Masernvirus isolieren.

Ein weiterer Nachweis der Multiplikation in Leukozyten gelang Berg mit Echo-9-Viren (30). In mehreren Versuchen konnten Titeranstiege bis zu maximal einer Stufe über die Inoculationsdosis festgestellt werden

Die letzte Veröffentlichung befaßt sich mit der nachgewiesenen Vermehrung von DNA-Virus Herpes simplex in menschlichen Leukozytenkulturen (31). Das Ergebnis zeigt zunächst einen Abfall der Titerkurve bis zum 4. Tage, dann ein Ansteigen um mehrere Titerstufen in der Zeit zwischen 6. und 18. Tag.

Erwähnt sei schließlich noch der interessante, durch Gresser erbrachte Nachweis einer Interferonproduktion durch Leukozyten (32). Unmittelbar nach Inkubation menschlicher Leukozytensuspensionen mit Sendai-Virus konnte er große Mengen Interferon im Medium feststellen.

3. Poliomyelitisvirus - Multiplikation in Leukozytenkulturen

Die eben angeführten Arbeiten, die überzeugend für die Möglichkeit einer Virusmultiplikation in Leukozytenkulturen sprechen, ferner die bewiesene Virämie bei der Poliomyelitisinfektion und die in vielen menschlichen Zellen beobachtete Vermehrung des Poliomyelitisvirus lassen mit einiger Sicherheit auch ein Eindringen des Poliomyelitisvirus in Leukozyten und dessen Vermehrung in diesen Zellen vermuten. Mit einer solchen Problemstellung befassen sich die folgenden Arbeiten:

Mannweiler (34) erwähnt 1961 Zusammenballungen von Virusantigenpartikeln in Leukozyten und das mögliche Vorhandensein von Viruskristallen in mit Poliomyelitisvirus infizierten Endothelzellen im ZNS von Rhesusaffen.

Ähnlich wie Gresser bei Masernpatienten konnte Köhler 1960 (35) Poliomyelitisvirus aus plasmolysierten Leukozyten vom Blut an Kinderlähmung erkrankter Kinder isolieren, und zwar vom 5. - 20. Tag nach Beginn der Lähmung. Seine Beobachtungen wurden 1964 durch Arbeiten von Kovács bestätigt (36). Durch Immunofluoreszenz und biologische Methoden konnte er Poliomyelitisviren in isolierten Leukozyten infizierter Affen nachweisen.

In einer weiteren Versuchsserie mit vorher immunisierten, künstlich infizierten Affen zeigte Köhler, daß auch bei schon bestehendem hohen Antikörpertiter in manchen Fällen noch Virus in den Leukozyten zu finden ist (37).

Nelson und Mitarbeitern (39) gelang es 1963 auf elektronenmikroskopischem Weg Viruskristalle in polymorphkernigen Leukozyten während einer Polioenzephalitisinfektion nachzuweisen.

Seine Vermutung, daß es sich hier um eine Beteiligung der Leukozyten an einer Virusmultiplikation handeln könnte, sah er durch den Nachweis einer auffallenden Virustitererhöhung im Gehirn des Patienten zur Zeit der Enzephalitis bestärkt.

Die Möglichkeit einer Vermehrung von Poliomyelitisviren in Leukozytenkulturen - das Thema dieser Arbeit - wurde bisher in zwei Arbeiten untersucht und diskutiert.

Berg, der 1961 eindeutig eine Vermehrung von Echo-Viren in menschlichen Leukozytenkulturen nachgewiesen hat (30), konnte unter gleichen Versuchsbedingungen eine Multiplikation von Poliomyelitisviren nicht feststellen.

Entgegengesetzt liegen die von Gresser und Chany 1963 erzielten Ergebnisse (40). Sie beobachteten in mit Poliomyelitisvirus beimpften Leukozytenkulturen nach einem initialen Titerabfall über wenige Tage einen ausgeprägten Anstieg der infektiösen Titer bis zum 8. Tag nach Inoculation. Die maximal erzielten Titer liegen mit $10^{6,5-7,0}$ $TCID_{50}/ml$ bis zu drei Stufen über dem Ausgangstiter.

Diese einander widersprechenden Ergebnisse veranlaßten uns zu überprüfen, ob und in welchem Ausmaß eine Multiplikation von Poliomyelitisviren in Suspensionen von menschlichen Leukozyten stattfindet.

II. METHODIK

1. Das Anlegen der Leukozytenkulturen

Zur Herstellung der Kulturen wurde die von Moorhead angegebene Methode in einer Modifikation von Nahmias benutzt (41,31). Der ganze Versuch mußte unter streng sterilen Kautelen durchgeführt werden.

A Material

1. Das bei allen Versuchen verwendete Kulturmedium wurde nach den Originalangaben von Eagle unter Zusatz von 10 % aktivem Kälberserum, 100 E Penicillin und 100 E Streptomycin pro ml hergestellte (42). Mit $NaHCO_3$ wurde die Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

2. Bacto-Phythämagglutinin (PHA) bewirkt nach Zugabe zu heparinisiertem Blut eine Agglutination der Erythrozyten; die Leukozyten bleiben nach dem Zentrifugieren in dem überstehenden Plasma suspendiert (43).

B Versuchsanordnung

1. 10-20 ml Blut aus der Armvene von Patienten der Universitätsklinik München entnommen, wurden zu gleichen Teilen auf 2 Reagenzgläschen verteilt, die je 0,2-0,4 ml Heparin (Liquemin) und o,15-0,3 ml Bacto-Phythämagglutinin enthalten. Das Blut wurde durch leichtes Schütteln gut gemischt und dann für 45 Minuten bei 4 ^{o} C aufbewahrt.

2. Anschließend wurde das Blut bei 450 UPM 5 Minuten zentrifugiert. Durch diesen Vorgang waren Erythrozyten einerseits und Plasma und Leukozyten andererseits mit ausgeprägter Trennungslinie voneinander geschieden. Das die Leukozyten enthaltende Plasma wurde mittels eines

Gummiballes abgesaugt und 10 Minuten bei 2000 UPM zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde verworfen.

3. Die sedimentierten Leukozyten wurden mit 5 ml Eagle's Medium aufgeschwemmt und erneut bei 2000 UPM 10 Minuten zentrifugiert. Die Leukozyten setzten sich am Boden des Reagenzglases ab; das überstehende Medium wurde abgegossen. Dieser Waschvorgang war im ganzen dreimal durchzuführen.

4. Nach der letzten Zentrifugierung wurden von den gewaschenen Leukozyten Ausstriche angefertigt, nach Giemsa gefärbt und ausdifferenziert.

5. In 5 ml Eagle's Medium und 0,05 ml Bacto-Phythämagglutinin wurden die Leukozyten aufgeschwemmt und anschließend die Konzentration der Leukozyten in der Suspension mittels einer Zählkammer festgestellt.

6. 4,5 ml dieser Leukozytensuspension - in ein Reagenzröhrchen eingebracht - stellte die zum Beimpfen bereite Leukozytenkultur dar. Das Röhrchen ist mit R 1 gekennzeichnet und trägt Datum und laufende Versuchsnummer.

7. Die Medium-Kontrolle, bestehend aus 4,5 ml Eagles Medium, ist mit R 2 markiert.

2. Virusinoculation

A Material

In allen Versuchen wurde Poliomyelitis-Virus Typ 1 (Brunhilde) verwendet.

B Versuchsanordnung

1. Der Titer der konzentrierten Virussuspension ist in einem Vorversuch mit Hela-Zellkulturen mit 10^7-10^8 TCID 50/ml ermittelt worden.

Für die Hauptversuche wurde der Titer jeweils auf Werte zwischen 10^3 und 10^6 TCID 50/ml eingestellt.

2. Die beiden vorbereiteten Kulturen R 1 = Leukozytenkultur
R 2 = Medium-Kontrolle
wurden mit je 0,5 ml der Poliovirusverdünnung beimpft.

3. Beide Röhrchen wurden in 20° Schrägstellung bei 37° C 8-10 Tage bebrütet.

3. Virustitration

A Material

Kulturen aus Hela-Zellen, ein von Scherer, Syverton und Gey aus menschlichen, epithelialen Cervix - Carcinom - Zellen aufgebauter Zellstamm, sind hochempfindlich gegenüber Poliomyelitisviren. Die Zellen zeigen nach Infektion einen im Mikroskop deutlich erkennbaren cytopathischen Effekt (CPE). Die Bewertung des Ausmaßes des CPE wurde von Kret genau definiert (47).

B Versuchsanordnung

1. Die Titerbestimmungen erfolgten im Röhrchenverdünnungstest auf 2 Tage alten Hela-Zellkulturen.

2. Am Inoculationstag, ferner am 2., 4., 6., 8. und in einigen Fällen am 10. Tage nach der Beimpfung wurden aus R 1 = Leukozytenkultur und
R 2 = Medium-Kontrolle
nach vorsichtigem Schütteln je 0,1 ml Suspension entnommen und in Potenzen von 10^1 bis auf 10^6 verdünnt.

3. Mit 0,1 ml jeder Verdünnung wurden jeweils 4 Röhrchen beimpft und unter Schrägstellung 4 Tage bei 37° C bebrütet.

4. Am 4. Tag wurde der zytopathische Effekt mit Hilfe eines Auflicht-Mikroskops nach der Gradeinteilung von Kret von 0 bis +++ abgelesen.

5. Aus den festgestellten Werten wird nach der Formel von Reed und Muench der negative Logarithmus derjenigen Einzeldosis pro ml ($TCID_{50}$ = Tissue Culture Infectivity Dosis) berechnet, die bei 50 % der Zellen einen CPE hervorruft (48).

III. ERGEBNISSE

1. Verhalten der Leukozyten in der Kultur

In den Versuchsröhrchen fanden sich vom 3. Tag an neben Einzelzellen auch Zellhaufen, teilweise in Suspension, teilweise wandadhärent. Während der 8-10 tägigen Bebrütung konnten keine zusammenhängenden Zell-Lagen (Monolayer) beobachtet werden. Die wandständigen Zellen ließen sich durch vorsichtiges Schütteln ablösen.

Infizierte und nichtinfizierte Leukozyten waren mikroskopisch nicht zu unterscheiden; ein sichtbarer zytopathischer Effekt trat nicht auf.

2. Titerverhalten von Poliomyelitisviren in Leukozytenkulturen

Die insgesamt durchgeführten 11 Versuche sind in der nebenstehenden Tabelle Nr. 1 in der Reihenfolge der Versuchsnummern mit den jeweils ermittelten Ergebnissen aufgeführt.

Tabelle 1: Poliomyelitistiter in Kulturen von menschlichen Leukozyten und in Leukozytenfreien Mediumkontrollen

a = Titer der Leukozytenkultur. b = Titer der Mediumkontrolle

Versuchs-Nr.		Poliomyelitisvirustiter Log $TCID_{50}$/ml					
		Tage nach der Inoculation					
		0	2	4	6	8	10
		Inocul. Tit.					
1	a		4,7	4,5	5,5	4,5	
	b	5,0	4,5	2,5	2,7	1,5	-
2	a		2,7	2,3	2,7	3,5	-
	b	3,7	3,0	1,7	0,5	0,0	-
3	a		4,3	4,8	5,4	5,7	4,7
	b	5,0	3,0	1,7	1,7	1,7	0,0
4	a		3,5	3,7	2,7	2,5	2,8
	b	4,7	3,5	3,5	1,5	1,5	0,0
5	a		3,5	4,3	5,0	4,7	-
	b	4,5	1,7	1,5	0,0	0,0	-
6	a		2,5	3,5	3,7	5,0	3,0
	b	3,3	1,8	1,7	1,5	0,0	0,0
7	a		4,7	4,0	4,3	3,3	-
	b	5,0	4,7	3,5	3,3	1,7	-
8	a		4,0	4,2	4,0	4,2	3,3
	b	4,5	3,5	2,7	1,7	1,7	0,0
9	a		3,6	3,3	2,7	0,5	-
	b	5,5	4,3	4,3	3,4	0,5	-
10	a		1,7	3,5	1,7	2,3	-
	b	3,3	2,7	2,0	0,0	0,0	-
11	a		6,5	5,3	4,5	-	-
	b	7,5	6,7	5,0	2,5	-	-

Jeder Versuch ist mit seinen Werten in einem Koordinatensystem wiedergegeben. Dabei wurde die Zeit auf der Abszisse und der log $TCID_{50}$/ml auf der Koordinate aufgetragen (siehe Anhang).

2. 1 Allgemeine Beobachtungen

Bei einem allgemeinen Überblick fällt auf, daß alle Versuchsabläufe ein grundsätzlich einheitliches Verhalten zeigen:

In sämtlichen Kulturen ist bis zum 2. Tag nach Inoculation ein regelmäßiger Titerabfall zu verzeichnen, der im Durchschnitt geringer ausgeprägt ist als in den Kontrollen (Abb. 1). In 10 von 11 Versuchen liegen vom 2. Tag an die Titer der Leukozytenkultur mit deutlichem Unterschied oberhalt der Titer der Mediumkontrolle. Dabei sind während dieser Zeit drei verschiedene Tendenzen des Titerverhaltens zu beobachten (Abb.1).

Während in einer Reihe von Versuchen die Titer in ihrem Gesamtverhalten geringgradig ansteigen, zeigt eine zweite Gruppe übereinstimmend einen langsamen Titerabfall. Dazwischen liegen die Versuche, deren Titer sich generell auf der ungefähren Höhe der Inoculationstiter bewegen.

Bei vier Versuchen wurde auch am 10. Tag nach Inoculation eine Titration durchgeführt. Sie ergab in allen Fällen deutlich niedrigere Titer als am 8. Tag. Nach dem Zerstören der Leukozyten am 8. bzw. 10. Tag fanden sich keine höheren Titer im Vergleich zu den auf die übliche Weise gewonnenen Werten.

Die Titration des Virusgehalts der zellfreien Mediumkontrollen ergeben im Gegensatz zu denen der Leukozytenkulturen einen Kurvenverlauf mit stark fallender Tendenz (Abb. 2).

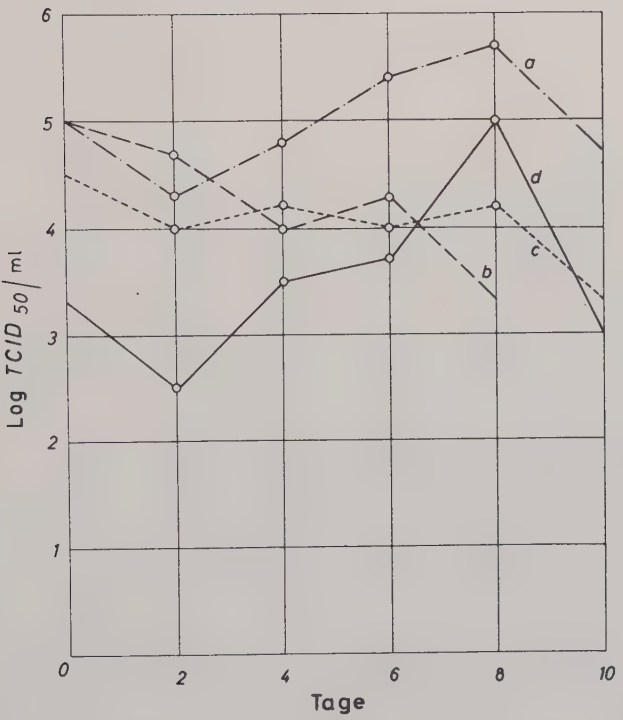


Abbildung 1

Poliomyelitisvirustiter in Kulturen von menschlichen Leukozyten. a, b, c, d stellen die Titerkurven von 4 repräsentativen Einzelversuchen dar (Versuche Nr. 3,7,8,6).

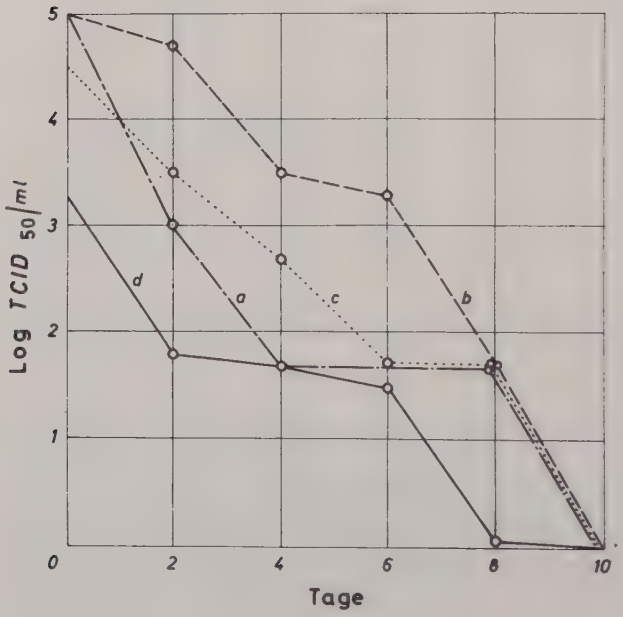


Abbildung 2

Poliomyelitisvirustiter in Leukozytenfreien Mediumkontrollen.
a, b, c, d stellen die Kontrolltiterkurven dar, die den Titerkurven 3,7, 8, 6 der Leukozytenkulturen entsprechen.

Bei einem Ausgangstiter von $10^{3,5}$ TCID $_{50}$/ml erreichen die Werte in der Regel nach acht Tagen, bei einem solchen von $10^{4,5}$ bis $10^{5,0}$ TCID $_{50}$/ml innerhalb von 10 Tagen den Nullwert. Die Kurven zeigen teils kontinuierlichen, teils treppenförmigen Verlauf.

2.2 Die Einzelversuche

Bei genauerer Betrachtung der einzelnen Versuchsabläufe fällt auf, daß vergleichsweise zu dem regelmäßigen Absinken der Kontrolltiter jeweils ein recht unterschiedliches Verhalten der Titer in der Leukozytenkultur vorliegt (siehe Anhang). Die 11 Einzeltiterkurven sollen deshalb im folgenden eingehender diskutiert werden.

Die Versuche 3,5 und 6 zeigen in ihrem Gesamtverhalten ein geringgradiges Ansteigen der Titer. Nach einem initialen Titerabfall bis zum 2. Tag erreichen in Versuch 5 die Titerwerte mit einem Anstieg um $10^{1,5}$ TCID $_{50}$/ml schon am 6. Tag ihr Maximum. In den Versuchen 3 und 6 ist bis zum 8. Tag ein Anstieg um $_{10}1,4$ bzw. $_{10}2,5$ TCID $_{50}$/ml zu verzeichnen. Der Anstieg ist während der 2 bis 3 Titrationsintervalle im großen und ganzen kontinuierlich und führt zu Überschreitungen der jeweiligen Inoculationsdosis um $_{10}0,5$ $_{10}0,7$ und $_{10}1,7$ TCID $_{50}$/ml. So ergeben sich in den Versuchen 5 und 6 die größten Differenzen von jeweils 4,7 und 5,0 Titerstufen zur Mediumkontrolle. In Versuch 3 wurde der höchste Titerwert mit $_{10}5,7$ TCID $_{50}$/ml am 8. Tage ermittelt. Er liegt $_{10}4$ TCID $_{50}$/ml über dem Kontrollwert und stellt den bei allen Versuchen gemessenen Maximalwert dar.

Die Titerkurven aller in eine zweite Gruppe einzureihenden Versuche verlaufen mit ihren Durchschnittswerten ungefähr in Höhe des Ausgangstiter. Die Kurvenverläufe sind dabei im einzelnen recht differenziert. Es sind auch hier Titeranstiege zu verzeichnen; die Titer steigen von einem Titrationstag zum anderen geringgradig an und fallen im folgenden Titrationsintervall in gleichem Maße wieder ab. Es ist also weder ein kontinuierlicher Anstieg noch Abfall über mehrere Tage zu beobachten. Die am 8. Tag ermittelten Werte liegen mit einem Abstand von $10^{2,3}$ bis $10^{3,5}$ TCID $_{50}$/ml zur Kontrolle nur geringgradig unter dem Inoculationstiter.

In Versuch 8 verläuft die Titerkurve nach geringem Abfall bis zum 2. Tag parallel zur Abszisse und liegt damit am 8. Tag $10^{0,5}$ TCID $_{50}$/ml unter der Inoculationsdosis.

In Versuch 1 steigen nach einem anfänglich leichten Titerabfall die Werte vom 4. bis 6. Tag um eine Titerstufe an, um im weiteren Ablauf bis zum 8. Tag in gleichem Maße wieder abzufallen.

Übereinstimmend mit Versuch 8 liegt der Titer am 8. Tag $10^{0,5}$ TCID $_{50}$/ml unter der Inoculationsdosis.

In Versuch 2 fällt der Titer bis zum 4. Tag relativ stark ab - am 2. Tag liegt er sogar gering unter dem Kontrollwert -, steigt aber dann bis zum 8. Tag wieder in gleichem Maße an und erreicht fast wieder die Höhe des Inoculationstiters.

In Versuch 10 beobachten wir ausgeprägt starke Titerschwankungen. Am 2. Tag nach Inoculation liegt der Titer eine Stufe unter dem Kontrolltiter, am 4. Tag jedoch $10^{0,2}$ TCID $_{50}$/ml über der Inoculationsdosis. Am 6. Tag ist der Titer erneut stark abgesunken und steigt bis zum 8. Tag nur noch wenig an.

Die Versuche 4, 7 und 11 zeigen übereinstimmend eine abfallende Tendenz der Virustiter in der Leukozytenkultur. Bis zum 2. Tag ist der Titerabfall in Kultur und Mediumkontrolle gleichstark angezeigt. Danach liegen jedoch alle Werte bis zum 8. Tag mit deutlicher Abweichung oberhalb der entsprechenden Kontrolle.

So liegen für die Versuche 4 und 7 die Titerwerte am 8. Tag $10^{1,7}$ und $10^{2,2}$ TCID $_{50}$/ml unter der Inoculationsdosis mit noch deutlichem Titerunterschied von $10^{1,3}$ und $10^{1,6}$ TCID $_{50}$/ml zur Kontrolle. In Versuch 11 fallen die Titerwerte bis zum 6. Tag um drei Titerstufen ab, beinhalten aber trotzdem noch eine Differenz von $10^{2,0}$ TCID $_{50}$/ml zur Kontrolle.

Versuch 9 stellt innerhalb dieser Versuchsserie einen Einzelfall dar. Die Titerwerte fallen bis zum 8. Tag in gleichem Maß wie die Kontrollwerte ab. Dabei liegen sie durchweg unter denjenigen der Kontrollwerte.

Die wichtigsten Ergebnisse aus den durchgeführten Versuchen lassen sich wie folgend zusammenfassen:

In 10 von 11 Versuchen liegen die Titerwerte der Leukozytenkulturen um $10^{1,3}$ bis maximal $10^{5,0}$ TCID $_{50}$/ml über den entsprechenden Titern der Kontrolle (Abb. 4).

In 5 von 11 Versuchen wird der Ausgangstiter zwischen dem 4. und 8. Tag überschritten. In 2 Versuchen liegt der Titerwert am 8. Tag noch oder wieder geringfügig unter dem Inoculationstiter.

Der höchste Titer, der erreicht wurde, liegt bei $10^{5,7}$ TCID $_{50}$/ml. Der Inoculationstiter wird maximal bis zu $10^{1,7}$ TCID $_{50}$/ml überschritten.

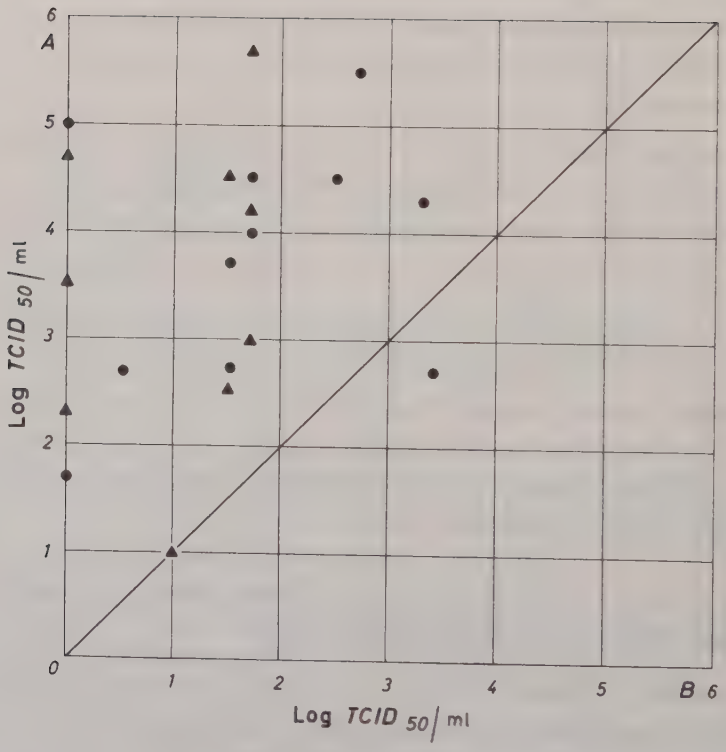


Abbildung 4

Poliomyelitisvirustiter in Leukozyten- und Kontrollkulturen am 6. und 8. Tag nach der Beimpfung. Abszisse = Titer der Mediumkontrollen Koordinate = Titer der Leukozytenkultur. Stimmen A und B überein, so liegt der Schnittpunkt auf der ausgezogenen 45° Linie. Liegt der Titer der Leukozytenkultur über dem der Kontrolle, so fällt der Punkt, bzw. das Dreieck in den Raum über der 45° Linie. ● = Werte des 8. Tages. ▲ = Werte des 6. Tages.

2.3 Titermittelwertkurven

Die Titermittelwertkurven (Abb. 3) sind aus den arithmetischen Mittelwerten der 11 Einzeltiter an jedem Titrationstag gebildet. Sie sind nur mit Vorbehalt zur Interpretation der Versuchsserie heranzuziehen, weil sie Ergebnisse von Versuchen mit unterschiedlichen Ausgangswerten zusammenfassen.

Die am 8. Tag auftretende größte Differenz der Titermittelwerte für Leukozytenkultur und Mediumkontrolle läßt sich statistisch nicht sichern, da beide Kollektive infolge wechselnder Ausgangstiter inhomogen sind.

Von diesen Einschränkungen abgesehen veranschaulichen die beiden Kurven (Abb. 3) jedoch überzeugend den grundsätzlichen Unterschied zwischen dem Titerverhalten in Leukozytenkultur und Mediumkontrolle. Bis zum 2. Tag fallen die Titer sowohl in der Leukozytenkultur als auch in der Kontrolle ab. Dabei ist der Abfall in der Leukozytenkultur nicht so stark wie in der Kontrolle. Dadurch, daß die Titer der Kontrolle fortlaufend stark absinken und die Titer der Leukozytenkultur sich ungefähr auf gleicher Höhe halten, weichen die beiderseitigen Mittelwertkurven immer stärker voneinander ab und führen zu immer größeren Titerdifferenzen, die am 8. Tag ihr Maximum erreichen.

3.1 Abhängigkeit der Poliomyelitis-Virusmultiplikation von der Inoculationsdosis (Tabelle 2)

Die Inoculationstiter lagen für die 11 Versuche zwischen $10^{3,3}$ und $10^{7,5}$ TCID $_{50}$/ml. Für Werte bis zu 10^{5} TCID $_{50}$/ml zeigte sich keine gesetzmäßige Abhängigkeit des Titerverhaltens von der Inoculationsdosis. Innerhalb dieses Bereichs waren sowohl bei den höheren als auch bei den niedrigeren Ausgangstitern ansteigende Tendenzen der Titer zu beobachten.

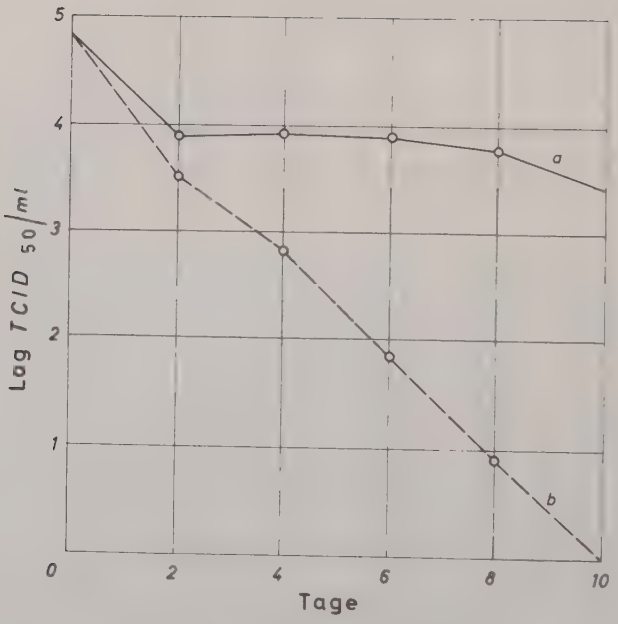


Abbildung 3

Kurve der Titermittelwerte aus 11 Versuchen

a = Leukozytenkultur b = Mediumkontrolle

In den Versuchen 9 und 11 liegt der Inoculationstiter über $10^{5,0}$ $TCID_{50}$/ml. In beiden Fällen ist ein ausgeprägtes Abfallen der Titer festzustellen.

3.2 Abhängigkeit des Titerverhaltens von der Leukozytenkonzentration (Tabelle 2)

Die Leukozytenkonzentrationen aller Versuche - außer Versuch 9 - bewegen sich von 2,1 bis 6,8 Mill/ml. Ein direkter Zusammenhang zwischen Titerverhalten einerseits und der jeweils vorliegenden Leukozytenkonzentrationen in der Kultur andererseits konnte in keinem der Versuche nachgewiesen werden. In Versuch 9 fällt auf, daß bei stark abfallenden, noch unter den Kontrollwerten liegenden Titern eine hohe Leukozytenkonzentration von 7,5 Mill/ml vorliegt.

3.3 Abhängigkeit des Titerverhaltens von der relativen Lymphozytenkonzentration (Tabelle 2)

In den 9 Versuchen, bei denen zum Zeitpunkt der Inoculation ein Ausstrich angefertigt wurde, ergeben sich recht unterschiedliche prozentuale Beteiligungen der Lymphozyten in der Leukozytenkultur. Die Anteile für die einzelnen Versuche liegen zwischen 24 und 74 %. Dabei ist folgendes festzustellen:

In Versuch 6, der den größten Titeranstieg zeigt, liegt die höchste prozentuale Beteiligung von 74 % der Lymphozyten am weißen Blutbild vor.

Auch die Versuche 1, 3 und 10, die alle einen Titeranstieg zeigen, der zur Überschreitung des jeweiligen Inoculationstiters führt, haben einen relativ hohen prozentualen Anteil der Lymphozyten von 43, 44 und 66 % in der Leukozytenkultur.

Tabelle 2: Abhängigkeit der Poliomyelitisvermehrung in Kulturen von menschlichen Leukozyten von der Leukozyten- bzw. Lymphozytenkonzentration und der Inoculationsdosis.

Versuchs-Nr.	Leukozyten /ml (Mill)	prozentualer Anteil der Lymphozyten	abs. Lymphozytenkonzentration (Mill)	Log TCID $_{50}$/ml					Titerdiff. zur Kontrolle am 8. Tag log TCID $_{50}$/ml
				Inocol. Titer	Tag nach der Beimpfung 2	4	6	8	
1	4,7	66	3,10	5,0	4,7	4,5	5,5	4,5	3,0
2	6,8	43	1,63	3,7	2,7	2,3	2,7	3,5	3,5
3	4,4	41	1,80	5,0	4,3	4,8	5,4	5,7	4,0
4	4,6	26	1,19	4,7	3,5	3,7	2,7	2,5	1,3
5	3,1	35	1,08	4,5	3,5	4,3	5,0	4,7	4,7
6	2,4	74	1,77	3,3	2,5	3,5	3,7	5,0	5,0
7	4,2	30	1,26	5,0	4,7	4,0	4,3	3,3	1,6
8	3,6	-	-	4,5	4,0	4,2	4,0	4,2	2,5
9	7,5	33	2,47	5,5	3,6	3,3	2,7	0,5	0,0
10	2,1	44	0,90	3,3	1,7	3,5	1,7	2,3	2,2
11	3,0	-	-	7,5	6,5	5,3	4,5	-	2,0

Den Versuchen 4, 7 und 9, die übereinstimmend abfallende Titerwerte mit nur geringer Differenz zur Kontrolle zeigen, liegen relativ niedrige Lymphozytenbeteiligungen von 24,33 und 30 % zugrunde.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß bei 4 der insgesamt 5 Versuche, deren Titer die Inoculationsdosis in verschieden starkem Maße überschreiten, jeweils die höheren Lymphozytenbeteiligungen von 43 - 74 % vorliegen, während bei den 3 Versuchen mit abfallender Tendenz der Titerwerte die niedrigeren Lymphozytenbeteiligungen von 33-26 % gegeben sind. In Versuch 5 sind jedoch bei relativ niedrigem Lymphozytenanteil starke Titeranstiege in der Leukozytenkultur zu beobachten.

IV. DISKUSSION

1. Multiplikation von Poliomyelitisviren in Leukozytenkulturen

In 10 von insgesamt 11 Versuchen lagen nach einem initialen Titerabfall die Titer der Leukozytenkulturen mit deutlicher Differenz oberhalb der entsprechenden Titer der Mediumkontrolle. Wie dieses Ergebnis hinsichtlich der Frage einer Multiplikation von Poliomyelitisviren in Leukozyten zu verstehen und zu werten ist, soll Gegenstand der folgenden Erörterung sein.

Es darf angenommen werden, daß sowohl in der Mediumkontrolle als auch in der Leukozytensuspension eine dauernde Wärmeinaktivierung des frei im Medium befindlichen Virus stattfindet.

In der zellfreien Kontrolle führt die Wärmeinaktivierung regelmäßig zu einem starken Titerabfall, so daß vom 7. bzw. vom 10. Tag an in der Mehrzahl der Versuche kein infektiöses Virus mehr nachweisbar ist.

Es ist zu vermuten, daß auch der während der ersten 2-4 Tage in den Leukozytenkulturen auftretende Titerabfall durch eine Wärmeinaktivierung der inoculierten Viren verursacht ist. In 6 Versuchen fallen die Titer bis zu diesem Zeitpunkt bereits deutlich weniger ab als in der Kontrolle.

Die vom 2. Tag an stärker abweichenden Titer der Leukozytenkultur von denen der Kontrolle sind als eine jetzt in gesteigertem Maße einsetzende Multiplikation und folgende Freisetzung des Virus durch die Leukozyten zu deuten. Neben dieser Virusmultiplikation in den Leukozyten hat man sich jedoch genau wie in der Kontrolle eine dauernde Wärmeinaktivierung des freien Virus vorzustellen. Infolgedessen sind die ermittelten Titerwerte als Resultanten dieser beiden gegenläufigen Vorgänge zu verstehen.

Während in Geweben mit hoher Multiplikationsrate die Virusinaktivierung nur wenig in Erscheinung tritt, bedeutet sie für ein gering empfindliches Zellsystem wie die Leukozytenkultur, bezüglich des Nachweises einer Virusvermehrung, einen wesentlichen Störfaktor.

So ist also sowohl das Überschreiten des Inoculationstiters als auch jeder positive Titerunterschied zwischen Leukozytenkultur und Mediumkontrolle als Virusvermehrung und -Freisetzung durch die Leukozyten zu verstehen.

Die Poliomyelitismultiplikation ist in den einzelnen Leukozytenkulturen graduell recht unterschiedlich. Ein ansteigender Verlauf der Titerkurve ist als Zeichen einer stärkeren, dagegen ist ein abfallender Kurvenverlauf als Beweis für eine schwächere Virusvermehrung in den Leukozyten aufzufassen.

Zusammenfassend ist folgendes zu sagen: Während der Zeit des initialen Titerabfalls ist neben der vorherrschenden Virusinaktivierung bereits in sechs Versuchen eine minimale Virusmultiplikation in den Leukozytenkulturen anzunehmen.

Eine gesteigerte Virusmultiplikation - bei den einzelnen Versuchen verschieden stark ausgeprägt - setzt nach dem anfänglichen Titerabfall ein und erreicht während des 6. - 8. Tages ihr Maximum.

2. Besondere Merkmale des Multiplikationsverhaltens von Poliomyelitisviren in Leukozytenkulturen

Das Multiplikationsverhalten von Poliomyelitisviren in Leukozytenkulturen unterscheidet sich in charakteristischer Weise von demjenigen in anderen Zellkulturen. Wir wollen zu einem solchen Vergleich Ergebnisse heranziehen, die das Titerverhalten von Poliomyelitisviren in Hela-Zellkulturen veranschaulichen und besonders zwei Unterschiede hervorheben (11).

2.1 Ein initialer Titerabfall bis zum Beginn einer Virusfreisetzung ins Medium ist grundsätzlich in beiden Zellsystemen zu beobachten. Der Titerabfall ist in Hela-Zellkulturen sehr gering und dauert nur bis zu maximal 10 Stunden. In Leukozytenkulturen hingegen ist der Titerabfall wesentlich stärker und dauert durchschnittlich 2-3 Tage.

2.2 In Hela-Zellkulturen werden bereits innerhalb von 24 Stunden höchste Titer erreicht, die um mehrere Stufen über dem Inoculationstiter liegen. Erst wesentlich später, zwischen 6. und 8. Tag, werden in Leukozytenkulturen maximale Titer beobachtet, die nur in wenigen Fällen den Inoculationstiter überschreiten.

Zu 2.1 Die besonders lang dauernde Latenzzeit bis zum Einsetzen einer Virusmultiplikation in Leukozytenkulturen ist nach heute bestehender Meinung auf die Heranbildung von spezifischen, zu einer Virusmultiplikation befähigten Zelltypen zurückzuführen (31,40). Im einzelnen sind zu diesem Thema verschiedene Untersuchungen angestellt worden. Die hieraus abgeleiteten Erklärungen werden nachfolgend kurz aufgeführt; eine eingehende Diskussion ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Mc Kinney beobachtete an Leukozytenkulturen, die mit Phythämagglutinin angelegt waren, daß nach einem Gesamtzellabfall um 45 % nach 24 Stunden fast nur noch mononukleäre Zellen in der Kultur vorhanden sind (45,46). In den darauffolgenden Tagen entwickeln sich zwei neue Zellarten - junge Lymphozyten und große mononukleäre Zellen -, die bald vollständig das Zellbild beherrschen. 24 Stunden nach Anlegen der Kultur setzt eine DNA-Synthese ein, die in den darauffolgenden Tagen noch stark zunimmt.

Nach 70 Stunden sind bis zu 1,5 % der Zellen in Mitose begriffen; ohne PHA unterblieb dagegen eine Leukozytenproliferation.

Aus diesen Beobachtungen des Zellverhaltens in Leukozytenkulturen lassen sich zwei mögliche Erklärungen für den langen Titerabfall folgern.

a) Die Leukozyten müssen sich, um Virus vermehren zu können, in einer bestimmten Wachstumsphase befinden.

b) Die ursprünglichen Zellen bleiben resistent gegen das Virus; erst die Tochterzellen sind empfänglich.

Zwei weitere von Holland und Gresser gemachte Beobachtungen lassen die folgenden Vermutungen zu (15,32):

c) Die Originalzellen der Kultur sind zum Zeitpunkt der Inoculation resistent. Sie entwickeln in Vitro erst langsam die für eine Virusaufnahme nötige Rezeptorsubstanz (15).

d) Infolge der starken Interferonbildung durch die Leukozyten in den ersten Tagen nach Inoculation ist während dieser Zeit eine gesteigerte Virusmultiplikation nicht möglich (32).

Ähnlich wie für Hela-Zellkulturen ist auch für Leukozytenkulturen eine Virusfreisetzung ins Medium erst mit deutlicher Zeitdifferenz nach Beginn der intrazellulären Virussynthese zu erwarten.

Diese Zeitspanne wird in Leukozytenkulturen relativ lang sein, und somit die bis zum Beginn einer Virusfreisetzung ins Medium verstreichende Latenzzeit noch verlängern.

Zu 2 Leukozytenkulturen ermöglichen nur eine sehr geringgradige Multiplikation von Poliomyelitisviren und sind daher als Zellsysteme mit nur niedriger Virusmultiplikationsrate zu bezeichnen. Die letztere ist einerseits durch den sehr niedrigen Prozentsatz an infizierten Zellen verursacht; so konnten Gresser in 1 % bis maximal 7 % und Nahmias in 1 % - 1,5 % der Leukozyten Virusantigenmaterial nachweisen (40,31). Andererseits ist in den einzelnen Leukozyten eine Virussynthese von relativ geringem Ausmaß anzunehmen.

Starke Titeranstiege sind also in den beimpften Leukozytenkulturen nicht zu erwarten.

Die im Vergleich zu anderen Zellsystemen über mehrere Tage andauernde Virusmultiplikation in Leukozytenkulturen wäre folgendermaßen zu erklären: Ort der Multiplikation sind jeweils nur wenige Zellen in der Kultur. Zur gleichen Zeit bilden sich laufend neue virusempfängliche Zellen heran. In diesen Zellen setzt sich dann wiederum die Virusmultiplikation fort. Man hat sich also einen dauernden Balancezustand zwischen der Heranbildung von virusempfänglichen Zellen einerseits und der Virusvermehrung in diesen Zellen mit fortwährender Abgabe des Virus in das Medium andererseits vorzustellen (31).

Dieser Zustand ist theoretisch über eine lange Zeit hin möglich, jedoch in der Kultur durch das langsame Absterben der Zellen zeitlich begrenzt.

3. Lymphozyten als Ort der Virusmultiplikation in der Leukozytenkultur

Die Frage, welche Zellen, ob Granulozyten oder Lymphozyten eine Multiplikation von Poliomyelitisviren in der Kultur bewirken, ist bislang noch nicht eindeutig beantwortet.

Gresser und Berg nehmen in ihren Arbeiten an, daß Virusmultiplikation in der Leukozytenkultur hauptsächlich in den Lymphozyten vor sich geht (30,40). In einer weiteren Arbeit stellte Gresser fest, daß in Leukozytenkulturen nach Virusinoculation Interferon durch die Lymphozyten produziert wird (32).

Weiterhin ist in diesem Zusammenhang nochmals zu erwähnen, daß nur bis zu 24 Stunden nach Anlegen der Kultur Granulozyten nachweisbar sind (46). Es kommen deshalb nach diesem Zeitpunkt nur noch die Lymphozyten und deren Abkömmlinge als Ort einer Virusmultiplikation infrage.

Für unsere Versuche läßt sich mit einiger Sicherheit vermuten, daß bei höherem prozentualen Anteil der Lymphozyten in der Kultur eine stärkere Virusmultiplikation stattfindet als bei niedrigen Lymphozytenkonzentrationen.

All diese Ergebnisse sprechen für die Annahme, daß in der Leukozytenkultur eine Virusmultiplikation in den Lymphozyten vor sich geht.

Die kurze Lebensfähigkeit der Granulozyten in der Kultur läßt jedoch die Möglichkeit offen, daß innerhalb der Blutbahn auch die Granulozyten genau wie die Lymphozyten Ort der Virusmultiplikation sein können.

Diese Vermutung unterstützen Beobachtungen von Nelson und Mitarbeitern einerseits und Sommerville andererseits, die im Blut virusinfizierter Patienten vorwiegend in polymorphkernigen Leukozyten Virusantigenmaterial nachweisen konnten.

4. Abhängigkeit der Virusmultiplikation von den Ausgangsbedingungen

Der Grad der Virusmultiplikation hat sich in den 11 durchgeführten Versuchen als sehr unterschiedlich herausgestellt.

Diese Tatsache ist zum Teil sicher auf eine bei den einzelnen Patienten unterschiedliche Bereitschaft der Leukozyten zur Virusmultiplikation zurückzuführen.

Zum anderen ist naheliegend, daß auch die Höhe von Leukozytenkonzentration und Ausgangstiter und vor allem aber der prozentuale Anteil der Lymphozyten in der Kultur einen entscheidenden Einfluß auf den Grad der Virusmultiplikation ausüben. Die Ergebnisse unserer Versuchsreihe gestatten uns zu der Frage nach den günstigsten Ausgangsbedingungen und Voraussetzungen für eine maximale Virusmultiplikation nur richtungsweisende Angaben zu machen; exakte Angaben lassen sie jedoch nicht zu.

4.1 Der Zusammenhang zwischen relativer Lymphozytenkonzentration in der Leukozytenkultur und der Höhe der stattfindenden Virusmultiplikation ist bisher noch keineswegs geklärt und bedarf noch eingehender Untersuchungen. Aus den im Rahmen unserer Versuchsreihe gemachten Feststellungen läßt sich die Vermutung ableiten, daß in Kulturen mit höherem Lymphozytenanteil eine stärkere Virusmultiplikation stattfindet als in Kulturen mit niedrigem Lymphozytenanteil. Der Prozentsatz an infizierten und Virus produzierenden Zellen müßte demnach bis zu einem gewissen Grade proportional der Lymphozytenkonzentration ansteigen.

4.2 Leukozytenkonzentrationen, die innerhalb von 2 bis 7 Mill/ml liegen, lassen einen sichtbaren Einfluß auf die Stärke der in der Kultur stattfindenden Virusmultiplikation nicht erkennen. Liegen die Leukozytenkonzentrationen jedoch über 7 Mill/ml, so erscheint die Virusmultiplikation infolge mangelnder Ernährung der Zellen durch das

Medium eingeschränkt. Bei Werten unterhalb von 2 Mill/ml liegt die Vermutung nahe, daß eine Virusmultiplikation dadurch beeinträchtigt wird, daß nicht genügend Zellen, in denen eine Virussynthese stattfinden kann, zur Verfügung stehen.

In Zusammenhang mit dem relativen Lymphozytenanteil könnte jedoch auch der Höhe der Leukozytenkonzentration bei Werten zwischen 2 und 7 Mill/ml Bedeutung zukommen. Als Faktor für einen möglichst hohen absoluten Lymphozytenanteil in der Kultur darf eine höhere Gesamtleukozytenkonzentration als begünstigende Voraussetzung für eine Virusvermehrung angesehen werden.

4.3 Bei Werten zwischen 10^3 und 10^5 $TCID_{50}$/ml war kein direkter Einfluß der Ausgangstiter auf die Stärke der Virusvermehrung in der Kultur festzustellen. Lagen die Ausgangstiter jedoch über $10^{5,5}$ $TCID_{50}$/ml, so konnten stark abfallende Titer beobachtet werden. Für diese Fälle mit hohen Ausgangstitern ist mit Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß - bei nur geringer Virusaufnahme durch die Leukozyten - der Anteil einer Wärmeinaktivierung anheimfallenden Viren besonders groß ist. Hier sind deshalb stark abfallende Titer - mit nur geringer Differenz zur Kontrolle - zu beobachten.

Bei extrem niedrigen Ausgangstitern ist die Annahme zulässig, daß zu dem Zeitpunkt, an dem sich zur Virusvermehrung befähigte Zellen ausreichend in der Kultur gebildet haben, nicht mehr genügend infektiöses Virus im Medium vorhanden ist.

Zum Schluß sei jedoch noch erwähnt, daß zusammenhängend mit dem jeweils vorliegenden Lymphozytenanteil auch die Höhe des Ausgangstiters bei Werten zwischen 10^3 und 10^5 $TCID_{50}$/ml für den Grad der Virusvermehrung von Bedeutung sein könnte. So war bei hohem Ausgangstiter und hohem Lymphozytenanteil eine relativ starke (Versuch 3), jedoch bei gleichem Ausgangstiter

aber geringem Lymphozytenanteil (Versuch 7) nur eine schwache Virusvermehrung in der Kultur zu verzeichnen. Andererseits fand bei geringer Lymphozytenbeteiligung und niedrigem Ausgangstiter noch eine beachtliche Virusvermehrung statt (Versuch 10). Eine maximale Virusvermehrung dürfte also beim Zusammentreffen von einerseits möglichst niedrigem Ausgangstiter, der aber in jedem Fall noch über $10^{3,0}$ $TCID_{50}$/ml liegen sollte und andererseits hohem prozentualen Lymphozytenanteil in der Kultur (Versuch 6) zu erwarten sein.

Aus unseren Ergebnissen lassen sich also die folgenden Ausgangsbedingungen feststellen, die eine verhältnismäßig starke Vermehrung von Poliomyelitisviren in Leukozytenkulturen ermöglichen und begünstigen.

Das Virus ist mit Ausgangstitern, die zwischen 10^3 und 10^5 $TCID_{50}$/ml liegen, in Leukozytensuspensionen mit möglichst hohem prozentualen Lymphozytenanteil - der letztere umso höher je höher der Ausgangstiter - zu verimpfen.

Die Höhe der Gesamtleukozytenzahl bei Werten zwischen 2 und 7 Mill/ml hat keinen direkten Einfluß auf die Virusvermehrung, sie kann lediglich indirekt über hohe absolute Lymphozytenkonzentrationen eine Multiplikation von Poliomyelitisviren in Leukozytenkulturen begünstigen.

5. Vergleich der Ergebnisse unserer Versuche mit den bisher vorliegenden Arbeiten

Gresser und Berg kamen bezüglich der Frage, ob eine Multiplikation von Poliomyelitisviren in menschlichen Leukozytenkulturen stattfindet, zu sehr widersprüchlichen Ergebnissen (30,40).

Unsere Versuche ergaben dabei in grundsätzlicher Übereinstimmung mit Gresser, daß unter exakt definierten Bedingungen eine Vermehrung von Poliomyelitisviren in menschlichen Leukozytenkulturen möglich ist.

Im Unterschied zu Gresser, der in der Mehrzahl der Fälle mit Titeranstiegen um 10^3 - 10^4 TCID $_{50}$/ml maximale Titer von $10^{6,5}$ - 10^7 TCID $_{50}$/ml erzielte, konnten wir nur in 5 von 11 Versuchen eine geringgradige Überschreitung des Inoculationstiters um $10^{0,5}$ - $10^{1,7}$ TCID $_{50}$/ml beobachten. Die höchsten in unserer Versuchsreihe festgestellten Titer liegen zwischen 10^5 und $10^{5,7}$ TCID $_{50}$/ml.

Das Ausmaß der Virusmultiplikation in Leukozytenkulturen zeigte sich in unserer Versuchsreihe als wesentlich geringer als in den von Gresser durchgeführten Versuchen. Die maximalen Titer, die Gresser beobachtete, konnten von uns in keinem Versuch nachgewiesen werden.

Als mögliche Erklärung dieser graduell voneinander abweichenden Ergebnisse sind zwei auffallende Unterschiede in den Ausgangsbedingungen beider Versuchsreihen zu diskutieren.

1. Die Ausgangstiter, die sich bei unseren Versuchen zwischen 10^3 und 10^5 TCID $_{50}$/ml bewegen, liegen bei Gresser mit Werten von 10^2 bis 10^3 TCID $_{50}$/ml deutlich niedriger (40).

   Niedrige Ausgangstiter sind nach unseren Beobachtungen bei gleichzeitig vorliegendem hohen prozentualen Lymphozytenanteil als günstige Voraussetzung für eine starke Virusmultiplikation anzusehen; es ist jedoch kaum anzunehmen, daß sie eine so extrem starke Virusvermehrung in der Kultur bewirken können.

2. Gresser setzt im Gegensatz zu der von uns angewandten Methode den zu beimpfenden Leukozytensuspensionen kein Phythämagglutinin zu.

Bei der Bedeutung, die dem PHA für das Zellverhalten in der Kultur zukommt, dürfte das Fehlen dieser Substanz eine Virusmultiplikation in Leukozyten keineswegs begünstigen, sondern viel eher verringern (45). So stellt Nahmias in zwei nebeneinander laufenden Versuchsreihe fest, daß unter Zusatz von PHA eine deutliche Virusmultiplikation stattfindet; ohne Zusatz von PHA ist sie in keinem Falle nachzuweisen (31).

Nach neueren Ergebnissen ist jedoch zu diesem Thema auch eine bisher noch nicht erwähnte Eigenschaft des PHA in Betracht zu ziehen (46). Sie besteht darin, daß diese Substanz auf die Leukozyten einen Anreiz zur Interferonproduktion ausübt und deshalb - im Gegensatz zu der oben vertretenen Ansicht - als hemmender Faktor für eine Virusmultiplikation in Leukozytenkulturen angesehen werden muß. Unter diesem Aspekt wäre die von uns festgestellte, wesentlich geringere Virusmultiplikation, als sie Gresser beobachten konnte, verständlich.

Die von Berg vertretene Auffassung, daß eine Multiplikation von Poliomyelitisviren in Leukozytenkulturen nicht möglich sei, konnte durch unsere Ergebnisse, die sich grundsätzlich mit Gresser decken, widerlegt werden.

6. Möglichkeit einer Multiplikation von Poliomyelitisviren in den Leukozyten innerhalb der Blutbahn

Abschließend stellt sich nun die Frage, ob eine Multiplikation von Poliomyelitisviren in Leukozyten, wie sie in der Kultur bewiesen ist, auch während der virämischen Phase im Organismus angenommen werden kann.

Weder für das Poliomyelitisvirus noch für die weiteren in der Leukozytenkultur sich vermehrenden Viren konnte bisher der Nachweis einer solchen Vermehrung in vivo erbracht werden.

Durch Versuche von Köhler und Kovàcs gilt es jedoch als grundsätzlich bewiesen, daß das Poliomyelitisvirus aus dem Blutplasma in die Leukozyten aufgenommen werden kann (35,36). Dasselbe konnte Gresser für Masernviren und Sommerville für Adeno-, Herpes- und Coxsackieviren nachweisen.

Aufgrund dieser Tatsache können wir deshalb mit einiger Wahrscheinlichkeit annehmen, daß sich die penetrierten Viren in den Leukozyten ähnlich verhalten, wie wir dies in den Kulturversuchen beobachteten.

Köhler interpretiert seine Ergebnisse dahingehend, daß die Leukozyten im Organismus im Dienste der Infektionsabwehr stehen (35,38). Nach seiner Meinung wird das Virus von den Leukozyten phagozytiert, wird zunächst als Anreiz zur Antikörperbildung einige Zeit virulent gehalten, um dann innerhalb der Leukozyten langsam inaktiviert zu werden.

Ganz anderer Ansicht ist Kovàcs, der - von gleichen Ergebnissen ausgehend wie Köhler - eine aktive Beteiligung der Leukozyten an der Verbreitung des Virus im Organismus annimmt (36). Die Leukozyten haben nicht nur die Aufgabe des Virustransports, sondern sie sind neben anderen Zellen als Ort der Virusmultiplikation im Körper anzusehen.

Nelson und Mitarbeiter vertreten aufgrund ihrer Versuche die gleiche Meinung (39).

Gresser und Chany, die selbst eine Multiplikation von Poliomyelitisviren in Leukozytenkulturen nachweisen konnten, halten es für gewagt, diesen Zellen eine große Bedeutung bei der Virusmultiplikation im Organismus zuzusprechen (40). Infolge der langen Anlaufzeit bis zum Einsetzen einer Virusmultiplikation in der Kultur und der geringen Infektionsrate unter den Leukozyten erscheint ihnen eine nennenswerte Multiplikation innerhalb der Blutbahn unwahrscheinlich.

Es ist bisher jedoch noch keineswegs bewiesen, daß für die Verhältnisse innerhalb der Blutbahn die Virusinfektionsrate unter den Leukozyten genauso niedrig anzunehmen ist wie in der Kultur.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben ergeben, daß das Virus im Organismus vorwiegend in polymorphkernigen Leukozyten enthalten ist (25,39). Außerdem können wir aufgrund der Tatsache, daß die Granulozyten in der Kultur durchschnittlich nur einen Tag lebensfähig sind, keine Aussage darüber machen, ob diese Zellen im Organismus nicht genau wie die Lymphozyten zu einer Virusaufnahme und Virusmultiplikation befähigt sind (44).

Die Vermutung liegt daher nahe, daß in der Blutbahn die Infektionsrate unter den Leukozyten möglicherweise höher ist als in der Kultur.

Ungeachtet der Höhe der Infektionsrate kommt nach unserer Auffassung - wobei wir mit der von Kovàcs vertretenen Meinung übereinstimmen - den Leukozyten eine wesentliche Bedeutung am Infektionsablauf und der Infektionsausbreitung im Organismus zu.

1. Die Leukozyten transportieren die penetrierten und dadurch gegen schädigende Einflüsse von seiten des Blutes geschützten Viren zu den tropen Organen und den Zellen des antikörperbildenden Systems.

2. Durch eine nur geringgradige, in diesen Transportzellen stattfindende Virusvermehrung können empfindliche Organsysteme, wie Gehirn und Rückenmark, stärker geschädigt werden, als dies allein durch die Verbreitung der infektiösen Viruspartikel durch den Blutstrom möglich wäre.

   Möglicherweise sind die infizierten mononukleären Leukozyten auch in die Antikörperbildung eingeschaltet.

   Weitere Untersuchungen zu diesem Fragenkomplex sind notwendig.

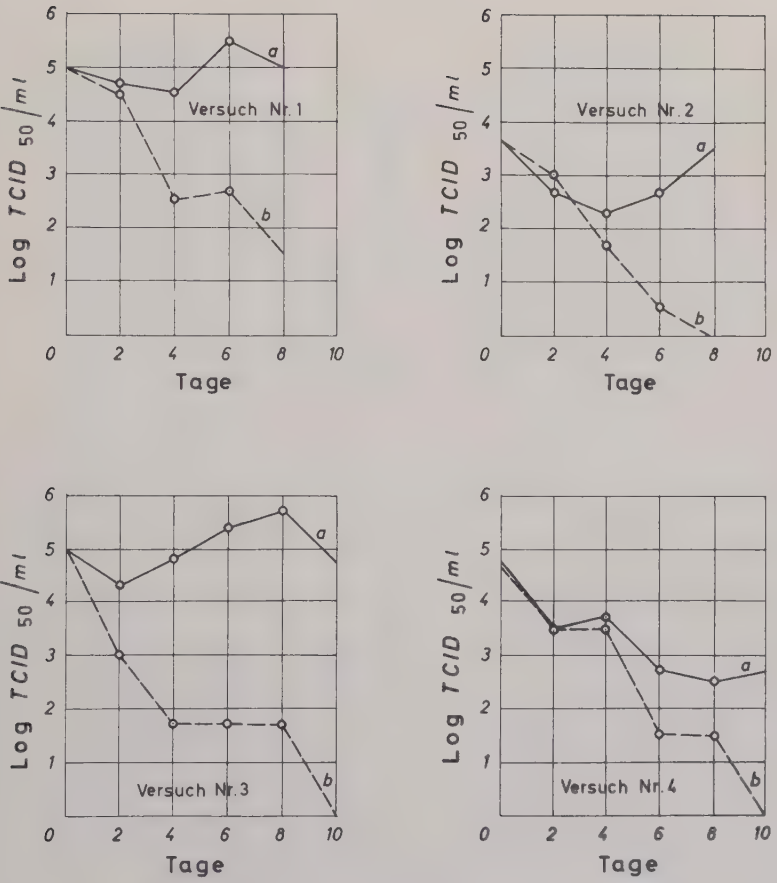
ZUSAMMENFASSUNG

Die Möglichkeit einer Vermehrung von Poliomyelitisvirus Typ 1 in Leukozytenkulturen wurde untersucht.

Ausgehend von Leukozytenkonzentrationen zwischen 2,1 und 7,5 Mill/ml und Ausgangstitern der Poliomyelitisvirussuspension von $10^{3,3}$ bis $10^{7,5}$ $TCID_{50}$/ml konnte in 10 von 11 Versuchen vom 6. bis 8. Tag nach Inoculation ein deutlicher Titerunterschied zwischen Leukozytenkultur und der ohne Leukozyten angelegten Mediumkontrolle festgestellt werden. Dagegen ergab nur ein Versuch einen ähnlich starken Abfall der Titer in der Leukozytenkultur wie in der zellfreien Kontrolle. Damit konnten wir - in weitgehender Übereinstimmung mit Gresser - zeigen, daß unter definierten Versuchsbedingungen eine Vermehrung von Poliomyelitisviren in Leukozytenkulturen möglich ist.

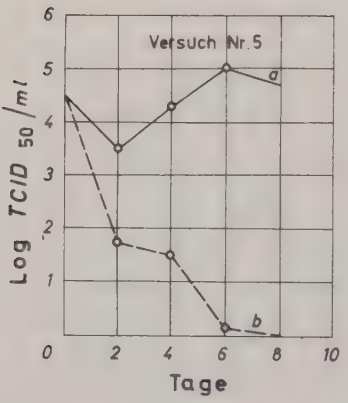
Besondere Merkmale des Multiplikationsverhaltens von Poliomyelitisviren in Leukozytenkulturen wurden diskutiert.

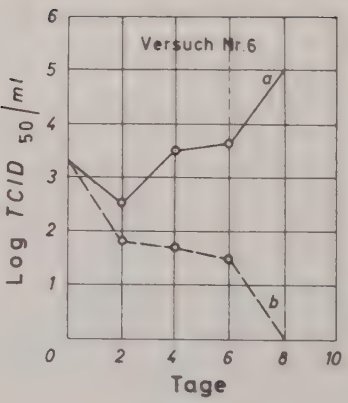
Eine Beteiligung der Leukozyten an der Vermehrung und Ausbreitung der Poliomyelitisviren im Organismus ist anzunehmen.

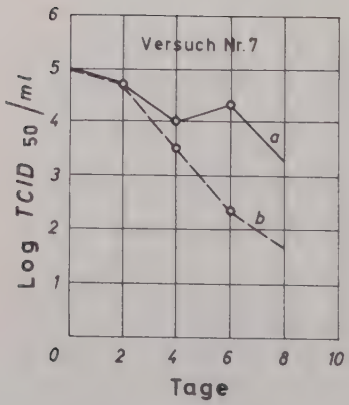


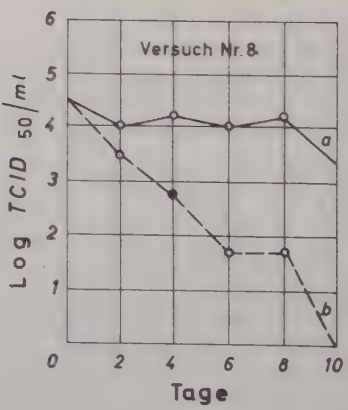
a = Leukozytenkultur
b = Kontrolle

Titerkurven der Versuche 1–4





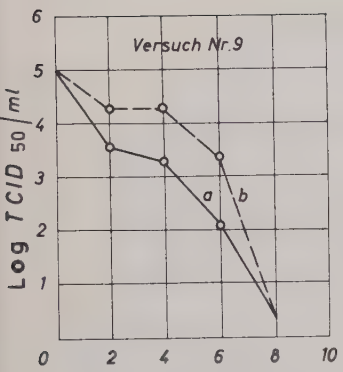


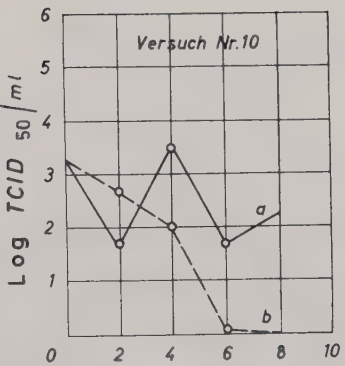


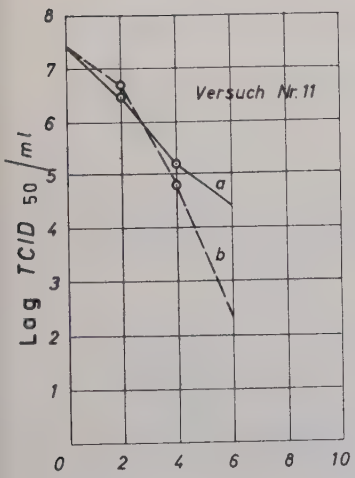
a = Leukozytenkultur

b = Kontrolle

Titerkurven der Versuche 5-8







a = Leukozytenkultur
b = Kontrolle

Titerkurven der Versuche 9-11

LITERATURVERZEICHNIS

(1) Bodian, D.: Emerging concept of poliomyelitis infection, Science V. 122, 105 (1955)

(2) Bodian, D.: A reconsideration of the pathogenesis of poliomyelitis. Amer.J.Hyg. V. 55 414 (1952)

(3) Sabin, A.B.: Pathogenesis of poliomyelitis. Science V. 123, 1151 (1956)

(4) Horstmann, D.M.: Poliomyelitisvirus in the blood of orally infected monkeys and chimpanzees Proc.Soc. Exp.Biol.Med. V, 79, 417 (1952)

(5) Horstmann, D.M. Mc Collum, R.W.: Poliomyelitisvirus in human blood during the minor illness and assymptomatic infection. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. V 82, 434 (1953)

(6) Horstmann, D.M. Mc Collum, R.W. Mascola, A.D.: Vireamia in human poliomyelitis. J. e p.Med. V. 99, 355 (1954)

(7) Bodian, D. Pfaffenberger, R.S.: Vireamia in experimental poliomyelitis. 1. General aspects of infection after inoculation with strains of high and low densities. Amer.J.Hyg. V. 60, 339 (1954)

(8) Scherer, W.F. Syverton, I.T. Gey, G.O.: Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells. J. exp.Med. V. 97, 695 (1953)

(9) Mattern, C.F.T. Wendell, A.D.: Replication of poliomyelitis-virus in hela-cells. Virolog. V. 26, 646 (1965)

(10) Kaplan, A.S. Melnick, I.L.: Multiplication of poliomyelitisvirus. Proc.soc.exp.Biol.Med. V. 90, 562 (1955)

(11) Salzman, N.P. Lockart, R.Z. Sebring, E.D.: Alterations in hela cell metabolism resulting from poliovirus infection. Virolog. V. 9, 244 (1959)

(12) Mosley, J.W. Enders, J,F.: Growth of poliomyelitisvirus in cotton-plugged kidney-cell-cultures. Virolog. V. 17, 251 (1962)

(13) Zitcer, E.M, Fogh, J. Dunnebacke, T.H.: Human amnion-cells for large-scale production of poliomyelitisvirus. Science V. 122, 30 (1955)

(14) Enders, J.F. Weller, T.H. Robbins, F.C.: Cultivation of the lansing strain of poliomyelitisvirus in cultures of various human embryonic tissues. Science V. 109, 85 (1949)

(15) Holland, J.J.: Receptor affinities as mayor determinants of enterovirus tissue tropisms in humans. Virolog. V. 15, 312 (1961)

(16) Horn, B.D. Tyrrell, A.J.: On the growth of certain newer respiratory viruses in organ cultures. Brit.J.exp.Path. V 46, 109 (1965)

(17) Schwartzman, G. Aronson, S.M.: Participation of brown fat in pathogenesis of experimental poliomyelitis of monkeys. Proc. Soc.Exp. Biol.Med. V 86, 767 (1954)

(18) Verlinde, J.D. Kret, A. Wyler, R.: The distribution of poliomyelitisvirus in cynomolgus monkeys following oral administration, tonsillektomie and intramuscular infection of diphteriatoxoid. Arch.ges. Virusforsch. V. 6, 175 (1954)

(19) Faber, H.K. Silverberg, R.J, Dong, L.: Studies on entry and egress of poliomyelitisinfection. J. exp.Med. V 97 69 (1953)

(20) Wenner, H.A. Kamitzuka, P.: On the presence of poliomyelitisvirus in regional lymphnodes. Pediatrics V. 16 770 (1955)

(21) Kantoch, M. Zapf, K.: Elektronenmikroskopische untersuchung über die lokalisation von coxsackierviren in leukozyten Acta Biol. Med.Germ. V. 3, 351 (1959)

(22) Baratawidjaja, R.K.: Demonstration of vaccinia lymphocytic choriomeningitis and rabiesvirus in the leucocytes of experimentally infected animals. Arch. ges. Virusforsch. V 17, 272 (1965)

(23) Danon, D. Jerushalmy, Z. Kohn, A. De Vries, A.: In vitro phagocytosis by leucozytes of influenzavirus adsorbed onto erythrocytes. Virolog. V. 15, 258 (1961)

(24) Inglot, A. Davenport, F.M.: Studies on the role of leucocytes in infection with influenzavirus. J. Immunol. V. 88, 55 (1962)

(25) Sommerville, R.G. Mc Garlane R.S.: The rapid diagnosis of virusinfections by immunofluorescent techniques applied to blood leucocytes. Lancet apr. 25, 911 (1964)

(26) Kovàcs,E. Nelson, E. Hager, H.: The possibility of limited multiplication of columbia-SK-virus in leucocytes. Proc. IV. Intrn.Congr.Neuropath. P. 164 (1962)

(27) Parikh, G. Shechmeister, I.L. Yen, R.S.: Bact.Proc. P. 160 (1963)

(28) Berg, R.B. Rosenthal, M.S.: Propagation of measles virus in suspensions of human leucocytes. Proc.Soc. exp.Biol.Med. V 106, 581 (1961)

(29) Gresser, I. Chany, Ch.: Isolation of measles virus from the washed leucocytic fraction of blood. Proc.Soc.exp.Biol.Med. V 113, 695 (1963)

(30) Berg, R.B.: Multiplication of echo-9-virus in suspensions of human leucocytes. Proc.Soc.exp.Biol.Med. V 108,742 (1961)

(31) Nahmias, A.J. Kibrik, S. Rosan, R.C.: Viral leucocyte interrelationships. I. Multiplication of a DNA-virus Herpes Simplex in human leucocyte cultures. J. Immunol. V. 93, 69 (1964)

(32) Gresser, I.: Production of interferon by suspensions of human leucocytes. Proc.Soc.exp.Biol.Med. V 108, 799 (1961)

(33) Nishmi, M.: The interactions between virus and leucocytes in vitro. Thesis for the Degree of a Doctor of Philosophie, Hebrew University, Jerusalem.

(34) Mannweiler, K.L.Palacios, O.: Ultrastrukturelle Veränderungen Am ZNS von Rhesusaffen nach Infektion mit Poliomyelitisvirus. Zentrbl.Natforsch. B. 166, 705 (1961)

(35) Köhler, H. Springer, D.: Neue Wege bei der Isolierung von Poliomyelitisvirus aus dem Blut an Kinderlähmung erkrankter Kinder, Zbl.Bact.I.Abt., Orig. B. 180, 145 (1960)

(36) Kovàcs, E. Baratawidjaja, R.K. Walmsley-Hewson, A. Labzoffsky, N.A.: Demonstration of poliovirus in isolated leucocytes, blood, and C.S.F. smears of infected monkey by immunofluorescence and biological means. Arch.ges.Virusforsch. B. 14 143 (1964)

(37) Köhler, H.: Rolle der Leukozyten als Virusträger, Zbl.Bakt. I.Abt., Orig. B. 180, 140 (1960)

(38) Köhler, H.: Isolierung von phagocytiertem Virus aus Leukozyten infizierter Tiere. Zbl.Bakt.,I.Abt.,Orig. B. 186 287 (1962)

(39) Nelson, E.Hager, H. Kovàcs , E.: Electronmicroscopic demonstration of virus crystals in poliomorphonuclear leucocytes. Science V. 139, 499 (1963)

(40) Gresser, I.Chany, Ch.: Multiplication of Poliovirus typel in preparations of human leucocytes and its inhibition by interferon. J. Immunol. V. 92, 889 (1963)

(41) Moorhead, P.S. Nowell, P.C. Mellman, W.J. Batipps, D.M. Hungerford, D.A.: Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. Exp.Cell Res. V. 20, 613 (1960)

(42) Eagle, H.: The nutritional requirements for the propagation of poliomyelitis virus by the hela-cell. J.exp.Med.V. 104, 271 (1956)

(43) Li, G.J. Good, E.E.: A method for the rapid separation of leucocytes and nucleated erythrocytes from blood with a phythemagglutinin from red beans. Blood V. 4, 670 (1949)

(44) Kinney Mc. A.A. Stohlman, J.R. Brecher, G.: The kinetics of cell proliferation in cultures of human peripheral blood. Blood V. 19, 349 (1962)

(45) Nowell, P.C.: Phythemagglutinin, an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. Cancer-Res. V. 20, 462, (1960)

(46) Wheelock, E.F.: Interferon-like virus-iuhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. Science, V. 149, 310 (1965)

(47) Kret, A.: Virological diagnosis of poliomyelitis by means of a simplified technique for the propagation of the virus in cultures of strain hela human epithelial cells. Arch. ges. Virusforsch. B. 6, 60 (1956)

(48) Reed, L.J. Muench, H.: A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Amer.J.Hyg. V. 27, 493 (1938)

LEBENSLAUF

Am 17.7.1941 wurde ich als 2. Kind des Dipl.Kfm. Dr. Heinrich Eckhardt und seiner Frau Elfriede, geb. Eckert, in Zwickau/Sachsen geboren.

In Borken/Bez. Kassel und Rendsburg/Schleswig-Holstein besuchte ich die Volksschule bis zur 4. Klasse und anschließend das Staatliche Gymnasium für Mädchen in Rendsburg und die Marienschule - Gymnasium für Mädchen - in Fulda/Hessen. An dieser Schule legte ich im Frühjahr 1961 das Abitur ab.

Ich begann mein Medizinstudium an der Universität Marburg und legte dort nach dem 2. Semester das Vorphysikum ab. An der Universität Tübingen setzte ich das Medizinstudium fort und bestand dort im Herbst 1963 das Physikum. Die klinischen Semester studierte ich an der Universität München und beendete im Dezember 1967 hier mein Studium mit dem Medizinischen Staatsexamen.

Zur Zeit arbeite ich als Medizinalassistentin am Städtischen Krankenhaus Überlingen/Bodensee.